

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL LIMBAH KULIT BUAH NAGA
MERAH (*Hylocereus polyrhizus*) PADA SEL KANKER PAYUDARA SECARA IN
INVITRO DAN IN SILICO**

Sarasma, M.A¹, Laksmiani, N.P.L.²

^{1,2}Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Korespondensi: Made Ary Sarasma
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 703837
Email: arysarasma@yahoo.com

ABSTRAK

Kanker payudara merupakan salah satu penyakit yang menimbulkan angka kesakitan dan kematian tertinggi. Penderita kanker payudara pada stadium lanjut menggunakan sitostatika yang meningkatkan resiko *adverse drug reaction*. Buah naga (*Hylocereus polyrhizus*) mengandung senyawa yang diduga berperan sebagai antioksidan. Kandungan flavonoid dalam kulit buah naga diduga memiliki aktivitas antioksidan yang mampu menurunkan ROS sehingga dapat mencegah kanker. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas sitotoksik ekstrak etanol kulit buah naga pada sel kanker payudara MCF-7 secara in vitro dan mengkaji mekanisme molekuler dari komponen aktif ekstrak etanol kulit buah naga secara in silico dengan protein target PgP, IKK dan HER-2. Uji sitotoksitas ekstrak etanol kulit buah naga merah dilakukan dengan metode MTT. IC₅₀ ekstrak kulit buah naga merah diukur terhadap sel MCF-7. Uji docking molekuler (*in silico*) dilakukan dengan preparasi protein, preparasi senyawa uji, validasi metode molekuler docking dan docking betasianin pada HER-2, Pgp dan IKK. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak kulit buah naga memiliki potensi sebagai agen sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 387,49 µg/mL. Potensi sitotoksik dari kulit buah naga merah diperantarai oleh kemampuan betasianin menghambat protein target IκB kinase (IKK) dengan afinitas -6,15 kkal/mol, sehingga NF-κB terinaktivasi dan proliferasi sel MCF-7 dapat terhambat.

Kata kunci : *Hylocereus polyrhizus*, sitotoksik, *carcinoma mammae*, betasianin, docking

1. Pendahuluan

Kanker payudara merupakan salah satu kanker terbanyak pada wanita yang menimbulkan angka kesakitan dan kematian yang tinggi (Ruddon, 2007). Salah satu target penting pada terapi kanker payudara adalah *Estrogen Receptor* (ER) seperti HER-2 yang mempunyai peranan dalam proliferasi dan perkembangan kanker payudara. Salah satu contoh agen kemoterapi yang digunakan adalah

doxorubicin. Penggunaan doxorubicin dapat menyebabkan resistensi karena dapat menginduksi over-ekspresi *P-glycoprotein* (Pgp) yang menyebabkan *efflux* (pengeluaran) obat kemoterapi dari dalam sel. Pgp merupakan *downstream* dari NFκB, suatu faktor transkripsi yang penting dalam proliferasi sel. Aktivitas NFκB diregulasi oleh IκB Kinase (IKK) (Deng *et al.*, 2001). Oleh karena itu

HER-2, Pgp dan IKK menjadi target yang penting dalam pengembangan agen bertarget molekular. Penggunaan agen kemoterapi berpotensi menimbulkan efek samping pada sel normal dan menekan sistem imun. Suatu pengembangan obat yang selektif terhadap sel kanker payudara namun tidak menimbulkan kerusakan pada sel normal diperlukan.

Salah satu upaya kemoprevensi adalah mengembangkan agen antikanker dari tumbuhan obat tradisional yang merupakan bagian dari keanekaragaman hayati Indonesia. Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) adalah tumbuhan buah yang mudah dijumpai dan sering hanya dimanfaatkan daging buahnya untuk konsumsi. Pemanfaatan limbah kulit buah naga belum banyak diteliti dan dikembangkan sebagai obat. Salah satu senyawa kimia yang memiliki efek antikanker adalah senyawa flavonoid. Flavonoid memiliki aktivitas menangkap radikal bebas (*Reactive Oxygen Species* / ROS) yang dapat menekan proses proliferasi sel kanker. Kulit buah naga diketahui memiliki kandungan flavonoid seperti betasianin.

Tujuan penelitian ini untuk mengembangkan limbah kulit buah naga merah sebagai agen antikanker pada sel kanker payudara melalui aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara yang dimodelkan oleh sel MCF-7 secara in vitro dengan menganalisis nilai IC_{50} dari ekstrak etanol kulit buah naga merah. Selain itu menganalisis mekanisme molekuler yang memperantarai efek sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara melalui docking molekuler atau *in silico*.

2. Metode Penelitian

2.1 Alat

Alat perlindungan diri, waterbath suhu 37°C, *Laminar Air*

Flow Hood (LAF), inkubator CO₂, *tissue culture flask/dish*, pen marker, mikropipet, tip, rak ampul/tempat eppendorf, alat-alat gelas, flakon, timbangan analitik, mikroskop cahaya, *inverted microscope*, tabung konikal, *haemocytometer*, *cell counter*, kamera digital, autoklaf, filter, vorteks, sentrifuse. Alat uji *in silico* meliputi seperangkat komputer dengan spesifikasi Windows 7 32 bit dan program co-PenDrive Linux untuk simulasi Linux pada Windows, Autodock 4.2 untuk molekular docking, Autodock 4.2 untuk preparasi protein, dan Marvin Sketch untuk preparasi senyawa uji betasianin.

2.2 Bahan

Kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*), etanol 96%, Sel kanker payudara jenis MCF-7. Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) *high glucose* yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisillin-streptomisin 1 % (v/v) (Gibco), tripsin.

2.3 Pembuatan Ekstrak

Bubuk simplisia kulit buah naga merah yang sudah dikeringkan dalam oven suhu 50°C selama 24 jam sebanyak 1 kg dimaserasi dengan pelarut etanol asam dengan perbandingan 1:5 (bahan: pelarut). Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan dan diremaserasi sebanyak 2 kali. Maserat kemudian disaring dan dipekatkan menggunakan *vaccum rotary evaporator*.

2.4 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT

Sel dengan kepadatan 1×10^4 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan

diinkubasi selama 24 jam. Media diambil, dicuci PBS, ditambahkan 100 μ l media kontrol atau sampel, inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μ l PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ l media kultur yang mengandung MTT 5 mg/ml, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan asam isopropanol 200 μ l untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.

2.5 Uji docking dengan Autodock

Uji docking dimulai dengan preparasi protein HER-2, IKK, dan PgP yang berikatan dengan native ligand. Optimasi struktur senyawa uji dilakukan dengan program Marvin Sketch. Pada tahap validasi metode docking molekuler, *native ligand* di-docking-kan kembali pada protein yang telah dihilangkan native ligand-nya. Hasil analisis menunjukkan *Root Mean Square Distances (RMSD) Heavy Atoms* senyawa hasil docking dibandingkan dengan referensi. Docking senyawa uji betasianin pada protein yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program Autodock 4.2.

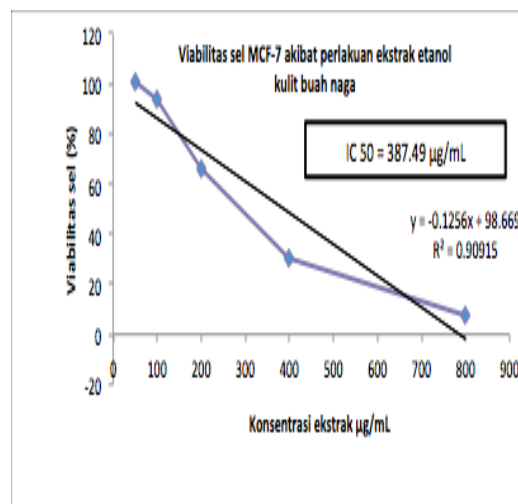
3. Hasil Penelitian dan Pembahasan

3.1 Bobot dan pH ekstrak etanol kulit buah naga

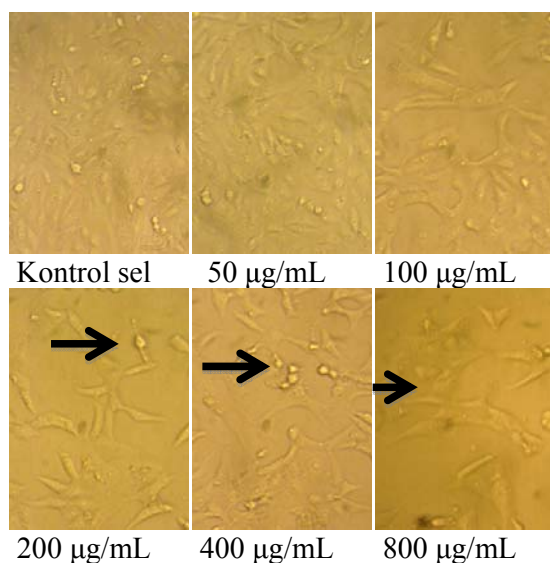
Bobot ekstrak kulit buah naga yang diperoleh sebesar 268,5448 gram dengan rentang pH ekstrak kulit buah naga yaitu 5,10 – 5,27.

3.2 Uji Sitotoksitas dengan metode MTT

Ekstrak etanol kulit buah naga merah mempunyai aktivitas sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} 387,49 μ g/mL. Efek sitotoksik ekstrak etanol kulit buah naga merah terjadi mulai konsentrasi 200 μ g/mL pada sel MCF-7 dimana mulai terlihat adanya sel yang mati yang terbentuk bulat mengambang dan rata-rata persentase viabilitas selnya \pm *standard error* (SE) dari 3 kali eksperimen adalah 66,1 % \pm 7,1.



Gambar 3.1. Efek perlakuan ekstrak etanolik kulit buah naga merah terhadap viabilitas sel MCF-7.



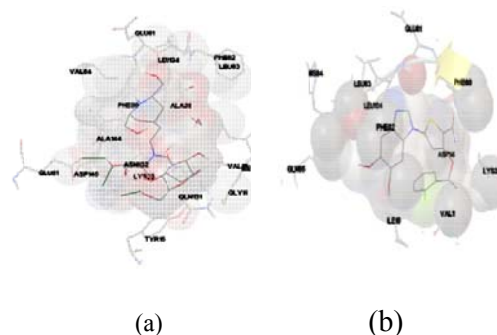
Gambar 3.2. Efek perlakuan ekstrak etanolik kulit buah naga merah terhadap morfologi sel MCF-7 setelah diinkubasi selama 24 jam.

Tabel di bawah ini menjelaskan tentang jumlah konsentrasi dan persentase viabilitas sel ekstrak etanol kulit buah naga.

Tabel 3.1 Persentase viabilitas sel \pm standard error (SE) ekstrak etanolik kulit buah naga merah

No	Konsentrasi	Persentase Viabilitas Sel			Rata-rata Viabilitas Sel \pm SE
	$\mu\text{g/mL}$	I	II	III	
1	50	100.67	89.91	111.24	100.61 \pm 6,16
2	100	93.92	105.41	82.26	93.86 \pm 6,68
3	200	52.19	70.6	75.52	66.1 \pm 7,1
4	400	26.85	35.97	29.04	30.62 \pm 2,75
5	800	4.07	7.17	11.18	7.47 \pm 2,06

3.3 Uji Docking Molecular dengan Metode Autodock



Gambar 3.3(a) Interaksi antara *native ligand* dengan protein target IKK; (b) Interaksi antara betanin dengan protein target IKK.

4. Pembahasan

Sel MCF-7 merupakan salah satu jenis sel adenokarsinoma payudara yang diperoleh dari pleural efusi wanita kaukasian berumur 69 tahun penderita kanker payudara golongan darah O, dengan Rh positif tahap metastasis. Sel MCF-7 tanpa perlakuan tidak menunjukkan adanya ekspresi Pgp, tetapi sel MCF-7 dengan perlakuan doxorubicin terjadi over-ekspresi Pgp (Simstein *et al.*, 2003). Pgp merupakan suatu transporter yang termasuk dalam keluarga *ATP-binding cassette* (ABC). NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang aktif akan meningkatkan transkripsi gen *MDR1* pengkode Pgp maupun protein anti apoptosis Bcl-2 (Ruddon, 2007). Pgp mempertahankan konsentrasi agen kemoterapi yang rendah di dalam sel dengan memompa obat ke luar dari sel, sedangkan Bcl-2 meningkatkan penghambatan dalam pemecuan apoptosis. Sehingga adanya inaktivasi NF- κ B oleh I κ B kinase (IKK) akan menghambat ekspresi Pgp maupun Bcl-2 (Deng *et al.*, 2001).

Sitotoksik merupakan sifat toksik atau beracun suatu senyawa terhadap sel yang hidup. Uji sitotoksitas secara *in*

vitro menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetika, zat tambahan makanan dan digunakan juga untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa (Ricci, 2006). Uji ini digunakan secara luas untuk menggantikan uji toksisitas secara *in vivo* yang menggunakan hewan. Beberapa alasan penggantian uji ini antara lain adalah uji sitotoksitas *in vitro* lebih ekonomis daripada uji toksisitas menggunakan hewan, keterbatasan model hewan untuk dapat dikorelasikan hasilnya pada manusia karena adanya perbedaan antar spesies, dan adanya dorongan moral untuk mengurangi percobaan yang menggunakan hewan (Ricci, 2006).

Sampai saat ini, aktivitas antioksidan kulit buah naga merah diketahui masih terbatas pada pengujian tingkat ekstrak dan fraksi. Penelitian menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit buah naga (IC_{50} 0,3 mg/ml) lebih tinggi daripada aktivitas antioksidan pada daging buahnya ($IC_{50} > 1$ mg/ml) (Nurliyana, 2012).

Penelitian lain juga melakukan uji aktivitas ekstrak kulit buah naga dengan beberapa pelarut yang tingkat kepolarannya berbeda-beda. Ekstrak kulit buah naga merah dalam pelarut n-heksana diketahui memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 853,543 μ g/ml (Putra, 2012). Ekstrak kulit buah naga merah dalam pelarut methanol memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 634,292 μ g/ml (Romadhona, 2012). sedangkan pengujian ekstrak kulit buah naga dengan pelarut kloroform menunjukkan aktivitas antioksidan yang cukup besar yaitu nilai IC_{50} sebesar 43,836 μ g/ml (Mitasari, 2012).

Sebelum dilakukan analisa docking molekuler dipastikan terlebih dahulu validitas dari metode yang digunakan dengan melihat nilai RMSD antara native ligan dengan protein target. Nilai RMSD yang dapat diterima dan metode dinyatakan valid bila RMSD 1-3 Å. Pgp

dengan ligan memiliki nilai RMSD 1,49, sedangkan IKK dengan ligan memiliki RMSD 0,74 dan HER-2 dengan ligannya, menghasilkan RMSD 2,62. Bila dilihat dari nilai RMSD maka interaksi molekuler dapat dilanjut ke tahap berikut.

Potensi sitotoksik dari kulit buah naga merah diperantarai oleh kemampuan betasianin menghambat protein target IkB kinase (IKK) sehingga NF- κ B terinaktivasi dan proliferasi sel MCF-7 dapat terhambat. Namun afinitasnya masih lebih rendah dari native ligannya untuk protein target IKK yaitu -6,15 kkal/mol sedangkan native ligan dengan IKK sebesar -9,82 kkal/mol.

Sedangkan ikatan antara betasianin dengan Pgp afinitasnya lebih besar (+15,90 kkal/mol) dibandingkan dengan native ligan yaitu -8,88 kkal/mol dan HER-2 dengan betasianin memiliki nilai energi ikatan sebesar +14,19 kkal/mol. HER-2 dengan ligannya sendiri, nilai energi ikatannya -7,01 kkal/mol. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol kulit buah naga merah memiliki potensi sitotoksik terhadap sel MCF-7 melalui penghambatan protein IKK sehingga proliferasi sel kanker payudara MCF-7 dapat dihambat.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah naga merah memiliki potensi sebagai agen sitotoksik pada sel kanker payudara melalui uji sitotoksitas secara invitro dan insilico. Hal ini dapat disebabkan karena ekstrak kulit buah naga banyak mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas anti oksidan dan mencegah pembentukan radikal bebas. Penelitian Rebecca (2010) menguji identifikasi pigmen dan aktivitas antioksidan ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). Dari hasil penelitian menggunakan instrument HPLC disebutkan buah naga merah mengandung betanin. Selain itu, nilai total fenolik buah naga sebesar 86,10 mg dari total 0,5 gram ekstrak kering buah naga. Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

penangkap radikal menunjukkan konsentrasi efektif buah naga sebesar 2,90 mM ekuivalen dengan vitamin C/gram ekstrak kering.

Penelitian Pranata (2013) menguji aktivitas antioksidan dari kulit buah naga merah dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan uji aktivitas antioksidan dengan metode KLT (kromatografi lapis tipis). Penelitian Pranata (2013) menyebutkan hasil skrining fitokimia ekstrak kulit buah naga mengandung flavonoid dan triterpenoid dan memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 3349,936 $\mu\text{g/ml}$ (Pranata, 2013).

5. Kesimpulan

Ekstrak kulit buah naga memiliki potensi sebagai agen sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} 387,49 $\mu\text{g/mL}$. Potensi sitotoksik dari kulit buah naga merah diperantarai oleh kemampuan betasianin menghambat protein target I κ B kinase (IKK) dengan afinitas -6,15 kkal/mol sehingga NF- κ B terinaktivasi dan proliferasi sel MCF-7 dapat terhambat.

6. Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diucapkan untuk Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Udayana, Fakultas MIPA Unud, Laboratorium Toksikologi Forensik, Lembaga Sains dan Forensik Unud, dan *Cancer Chemoprevention Research Center* Universitas Gadjah Mada.

6. Daftar Pustaka

Chahar, M.K., Sharma, N., and Joshi, Y.C. 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Review*. Jan-Jun; **5**(9): 1-12.

Deng, L., Lin-Lee, Y.C., Claret, F.X. and Kuo, M.T. 2001. 2-Acetylaminofluorene Up-regulates Rat *mdr1b* Expression through Generating Reactive Oxygen Species That

Activate NF- κ B Pathway. *J. Biol. Chem.* **276** (1),413–420.

DeVita, V.T., Theodore, S.L. and Steven A.R. 2011. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 9th edition. Wolters Kluwer. Lippinot Williams and Wilkins. USA.

Fajriani, H.Q. 2013. Penentuan Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Naga Super Merah (*Hylocereus costarioensis*) dan produk olahannya berupa permen jelly. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Pendidikan Indonesia, hal 1-5.

Fortugno, P., Wall, NR., Giodini, A., 2002. Survivin Exists in Immunochemically Distinct Subcellular Pools and is Involved in Spindle Microtubule Function. *J Cell Sci.* **115**: 85-575.

Gibbs, J.B. 2000. Anticancer Drug Targets: Growth Factor and Growth Factor Signaling. *J. Clin. Inves.* **105** (1): 9-13.

Jamilah, B., Shu, C. E., Kharidah, M., Dzulkifly, M. A., and Noranizan, A. 2011. Physico-chemical Characteristics of Red Pitaya (*Hylocereus lemairei*) Peel. *Int. Food. Res. J.* **18**: 279-286.

King, R. J. B. 2000. *Cancer Biology*, 2nd edition, Pearson Education Limited. London.

Kitagawa, S. 2006. Inhibitory Effect of Polyphenols on P-Glycoprotein-Mediated Transport. *Biol. Pharm. Bull.* **29**(1):1-6.

Mitasari, A. 2012. Uji Aktivitas Ekstrak Kloroform Kulit buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus* Britton & Rose) Menggunakan Metode DPPH (1,1-Defenil-2-Pikril Hidrazil). *Skripsi*. Pontianak: Program Studi Farmasi. Universitas Tanjungpura. Hal. 51; 68.

Nurliyana, R., Syed Z. I., Mustapha S.K., Aisyah, M. R., dan Kamarul R. K. 2010. Antioxidant study of pulp and peel dragon fruits: a comparative study. *Int. Food. Res. J.* **17**:365-375.

- Putra, T. U. 2012. Uji Aktivitas Ekstrak-Heksana Kulit buah Naga Merah(*Hylocereus polyrhizus* Britton & Rose)Menggunakan Metode DPPH (1,1-Defenil-2-Pikril Hidrazil). *Skripsi*.Pontianak: Program Studi Farmasi,Universitas Tanjungpura. Hal. 52.
- Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B., and Diederich, M. 2008. Modulation of Anti-apoptotic and Survival Pathways by Curcumin as a Strategy to Induce Apoptosis in Cancer Cells.*Biochemical Pharmacol.***76**: 1340–1351.
- Ricci, M.S., and Zhong, W.X. 2006. Chemotherapeutic Approaches for Targetting Cell Death Pathways.*The Oncologist*.**11**:342-357.
- Romadhona, A. 2012. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus* Britton & Rose) Menggunakan Metode DPPH (1,1-Defenil-2-Pikril Hidrazil). *Skripsi*. Pontianak: Program Studi Farmasi. Universitas Tanjungpura. Hal. 51.
- Ruddon, R.W. 2007. *Cancer Biology*, Fourth Edition. Oxford University Press.
- Sastrohamidjojo, H., 2007. *Spektroskopi*. Edisi Kedua. Penerbit Liberty. Yogyakarta
- Shan D. Z., Seng J. F., Pi C. N., Yuan L.G. and Gang Z. C. 2008. Isolation and Identification of an Anti-tumor Component from Leaves of *Impatiens balsamina*. *Molecules*. **13**. 220-229.
- Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., and Beckman, B. 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights from the MCF-7 Cell Model System, *Experimental Biology and Medicine*.**228**: 995-1003.
- Singh, N. 2007. Apoptosis in Health and Disease and Modulation of Apoptosis for Therapy: An Overview, *Indian J. of Clin. Biochemistry*.**22** (2): 6-16.